

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : C07K 7/06, A61K 7/48, 38/07, 38/34</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 95/08564</b> (43) Date de publication internationale: 30 mars 1995 (30.03.95)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/01108 (22) Date de dépôt international: 22 septembre 1994 (22.09.94) (30) Données relatives à la priorité: 93/11281 22 septembre 1993 (22.09.93) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT EUROPEEN DE BIOLOGIE CELLULAIRE [FR/FR]; 18, avenue de l'Europe, F-31520 Ramonville-Saint-Agne (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DUSSOURD d'HINTERLAND, Lucien [FR/FR]; 10, rue Pierre-Benoît, F-31400 Toulouse (FR). PINEL, Anne-Marie [FR/FR]; Résidence Herbemont, Le Galoubet, 1, rue Raymond-Delmotte, F-31400 Toulouse (FR). (74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, FL, GE, HU, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LT, LV, MD, MG, MN, NO, NZ, PL, RO, RU, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</p>
<p>(54) Title: PEPTIDE DERIVATIVES OF <math>\alpha</math>-MSH AND THEIR APPLICATION (54) Titre: DERIVES PEPTIDIQUES DE L'<math>\alpha</math>-MSH ET LEUR APPLICATION (57) Abstract Compound comprising a peptide sequence having at least one sequence of 4 amino acids from <math>\alpha</math>-MSH, the amino acids being in natural or non-natural form, said sequence being conjugated with thioctic acid or a derivative thereof in the form of corresponding salts, esters or amides. (57) Abrégé La présente invention concerne un composé comportant une séquence peptidique comprenant au moins une séquence de 4 acides aminés provenant de l'<math>\alpha</math>-MSH, les acides aminés étant sous forme naturelle ou non, ladite séquence étant conjuguée avec l'acide thioctique ou un dérivé de cet acide, sous forme de sels, esters ou amides correspondants.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brsil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Sllovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

## 1

DERIVES PEPTIDIQUES DE L' $\alpha$ -MSH ET LEUR APPLICATION

La présente invention a notamment des dérivés peptidiques de l' $\alpha$ -MSH ("Melanocyte Stimulating Hormone"), présentés sous forme Lipoyl-Peptides.

5 L' $\alpha$ -MSH et ses homologues ont fait l'objet de nombreuses publications, voire même d'essais thérapeutiques sans que cela se traduise par la réalisation d'un médicament.

La raison principale, est l'extrême ubiquité de l' $\alpha$ -MSH en fonction des doses administrées et des voies d'administration.

10 En plus l'absence de relation doses/effets, (ce qui est le cas de nombreuses hormones peptidiques), complique sérieusement son utilisation thérapeutique.

Les récepteurs cellulaires de l' $\alpha$ -MSH et de ses homologues sont du type G et la transduction intra-cellulaire s'effectue selon le cycle de l'AMP cyclique. L'activation de ces récepteurs cellulaires est sensiblement  
15 inversement proportionnelle aux doses d'hormones peptidiques, acceptées par les structures du récepteur membranaire.

La présente invention repose sur la recherche de structures peptidiques spécifiquement orientées vers les activités anti-allergiques et anti-inflammatoires d'une part, et activatrices de la mélanogénèse d'autre  
20 part à l'exclusion de tout autre effet pharmacologique notamment au niveau du système nerveux central, comme du système nerveux périphérique.

Plus particulièrement, la présente invention concerne un composé comportant une séquence peptidique comprenant au moins une séquence de 4 acides aminés provenant de l' $\alpha$ -MSH, les acides aminés étant sous forme  
25 naturelle ou non, ladite séquence étant conjuguée avec l'acide thioctique ou un dérivé de cet acide, sous forme des sels, esters ou amides correspondants.

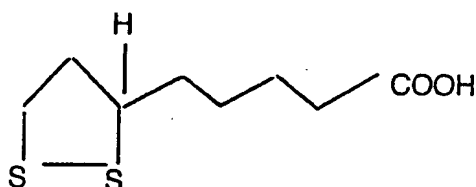
La séquence de l' $\alpha$ -MSH est la suivante :

N-acétyl - Ser - Tyr - Ser - Met - Glu - His -

Phe - Arg - Trp - Gly - Lys - Pro - Val - NH<sub>2</sub> -

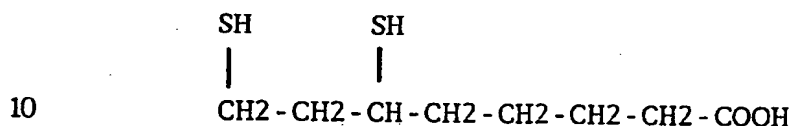
30 Dans cette définition, comme dans ce qui va suivre, les acides aminés peuvent être sous forme D, L ou D,L et les formes non naturelles des acides aminés correspondent à des dérivés, notamment substitués.

L'acide thioctique ou acide  $\alpha$ -lipoïque peut se présenter sous la forme oxydée :



5

ou sous forme de dérivé dihydrolipoïque :



10

Parmi les dérivés de cet acide, il faut citer le dérivé N-lysine de la forme oxydée ou dihydro.

Un des objets principal de la présente invention, est l'application thérapeutique par voie topique (cutanée) des dérivés précédents.

Ces composés sont des molécules capables de franchir la barrière cutanée, et de présenter la fraction peptidique aux récepteurs cellulaires, en induisant une réponse biologique du type relation doses/effets.

Ces peptides de bas poids moléculaire, dont les séquences d'acides ont été modifiées, sont liés sous forme de sels, d'Esters ou d'amides à des groupements biochimiques actifs, jouant un rôle capital dans le cycle Tricarboxylique (au niveau des Mitochondries notamment). Ces cofacteurs sont les acides lipoïques ou thioctiques sous forme oxydée ou réduite et leurs dérivés Lipoyl-Lysine, qui sont naturellement liés par covalence aux chaînes polypeptidiques du système enzymatique cellulaire.

Plus spécifiquement, la présente invention concerne des peptides de 4 à 6 acides aminés liés sous forme de Lipoyl-Peptides et de Lipoyl-Lysyl-Peptides à activité anti-allergique, anti-inflammatoire et activateur de la mélanogénèse.

30

Les composés selon l'invention présentent de préférence la séquence peptidique comportant au moins la séquence suivante :

- His - Phe - Arg -

- 5 dans laquelle Phe représente la phénylalanine ou un dérivé halogéné de la phénylalanine, les acides aminés pouvant être sous forme D, L ou D,L, et en particulier il peut s'agir de composés possédant la formule :

[Lip] X - His - Phe - Arg - Y

dans laquelle

Lip est l'acide thioctique ou un de ses dérivés,

- 10 X est Glu, OH ou NH<sub>2</sub>,

Y est            Trp - Gly - OH,  
                  Trp - Gly - NH<sub>2</sub>  
                  Trp - NH<sub>2</sub>  
                  Trp - OH

- 15 Phe est homo Phe ou p-fluoro Phe,  
les acides aminés étant sous forme D, L ou D,L

L'invention concerne tout particulièrement les composés suivants :

- I [(DL) Lip] Glu --- His --- D.homoPhe --- Arg --- Trp --- Gly --- NH<sub>2</sub>  
20 II [(DH Lip] Glu --- His --- D.homoPhe --- Arg --- Trp --- Gly --- NH<sub>2</sub>  
III [(DL) Lip] Glu --- His --- ParaFluoroPhe --- Arg --- Trp --- Gly --- NH<sub>2</sub>  
IV [(DL) Lip] His --- D.homoPhe --- Arg --- Trp --- NH<sub>2</sub>  
V [N.Lipoyl-Lysine] Glu --- His --- D.homoPhe --- Arg --- Trp --- Gly --- NH<sub>2</sub>  
VI [N.lipoyl-Lysine] His --- D.homoPhe --- Arg --- Trp --- Gly --- NH<sub>2</sub>  
25 VII [N.lipoyl-Lysine] His --- D.homoPhe --- Arg --- Trp --- NH<sub>2</sub>

ainsi que les dérivés de ces molécules sous forme de sels d'esters ou d'amides.

- 30 Dans les formules, la position de l'acide thioctique correspond au dérivé ester ou amide, la fraction acide de l'acide thioctique assurant la liaison.

- Les séquences d'acides-amino mentionnées précédemment peuvent être des séquences d'acides-amino naturels ou des séquences d'acides-amino non naturels. De même dans certains cas il est possible que certains de ces acides-amino comportent des fonctions par exemple ils sont  
35 glycosylés et/ou sulfatés.

Il doit être entendu que l'ensemble de ces formes est couvert par la présente description.

La présente invention concerne également des compositions pharmaceutiques ou dermo-cosmétiques comportant un composé tel que défini précédemment.

5 Les compositions pharmaceutiques peuvent être sous forme administrable par voie orale ou parentérale, intrapéritonéale ou injectable notamment, mais de préférence sous forme administrable par voie topique externe.

10 Ces compositions peuvent être, notamment, sous forme de crème, spray ou lotion par exemple et comporter des excipients connus et éventuellement d'autres principes actifs.

Les composés selon la présente invention sont utiles notamment dans la prévention et le traitement des allergies et des inflammations.

15 Le Peptide III dont la séquence possède en position 3 l'acide paraFluoro Phényl, est particulièrement orienté vers une activité anti-allergique et anti-inflammatoire, par immunosuppression des Monokines (IL1, IL6,  $\alpha$  TNF).

20 Les compositions dermo-cosmétiques sont de préférence sous forme de solution, de lotion, d'émulsion ou de crème utilisables en particulier comme accélérateur de bronzage de la peau sans exposition aux rayons ultraviolets.

Les Peptides II et IV dont les séquences possèdent en position 3 et 2 l'acide D.homo Phényl sont particulièrement orientés vers une stimulation des processus de mélanogénèse et d'activation de la Tyrosinase.

25 Les séquences Peptidiques selon la présente invention peuvent être obtenues par l'un des procédés quelconques connus de l'homme de métier, notamment par des procédés de synthèse chimique dans laquelle on peut intégrer l'acide thioctique. En tout état de cause compte tenu de la faible dimension des Peptides, la synthèse chimique est tout à fait possible et permet d'obtenir des produits très purs.

Exemple 1Synthèse du composé 1

1 - [(DL) Lip] Glu — His — D.homoPhe — Arg — Trp — Gly — NH<sub>2</sub>

La synthèse est réalisée par la méthode de Merrifield en phase  
5 solide en utilisant une résine MBHA et comme groupement protecteur FMOC (fluorényl méthoxy carbonyl).

Les dérivés d'acides aminés utilisés sont :

FMOC — Gly — OH,

FMOC — Arg (Tos) — OH,

10 FMOC — Trp — OH,

FMOC — D.homo.Phe — OH,

FMOC — His — (Trt) — OH

FMOC — Glu — chex) — OH

que l'on couple en utilisant le BOP comme agent de couplage.

15 Chaque acide aminé est utilisé en excès (x2) ainsi que le BOP (x2) et chaque couplage est répété 2 fois.

L'acide Lipoïque est couplé de façon similaire, le groupement FMOC est éliminé à chaque étape par la pipéridine (20 % dans le diméthylformamide).

20 La déprotection finale est effectuée en deux étapes :

a) acide Trifluoroacétique (2 fois x 5 minutes)

b) acide Fluorhydrique anhydre/p-Crésol 95,5 (45 minutes)

Le composé brut obtenu avec un rendement de 78 % est repris dans un mélange eau/acide acétique 95,5 % et est ensuite lyophilisé.

25 Le composé 1 obtenu a une pureté de 82 % (HPLC).

100 mg de ce composé sont purifiés par HPLC en utilisant une colonne C18

On obtient 65 mg de produit pur.

Temps de rétention = 17,04 minutes dans les conditions suivantes :

- colonne C8 (250 mm x 5 mm), détection UV 210 nm

30 - solvant tampon phosphate Triéthylamine - acétonitrile 10-60 % en 15 minutes - débit 1,4 ml /minute.

Analyse des acides aminés :

Glu 1,02 - Gly 1,01 - His 1,00 - Arg 0,94 - D.homo.Phe 1,03 -

Le Tryptophane n'a pas été déterminé car il se dégrade lors de l'hydrolyse acide.

Spectre de masse (FAB +) 1018,4/1126,5

5 Exemples 2 et 3

En remplaçant l'acide DL lipoïque par l'acide DH lipoïque, on obtient le composé 2 :

[DH Lip] Glu -- His -- D.homoPhe -- Arg -- Trp -- Gly -- NH<sub>2</sub>.

10 En remplaçant FMOC D.homoPhe - OH par FMOC ParafluoroPhe - OH, on obtient le composé 3 :

[(DL) Lip] Glu -- His -- ParaFluoroPhe -- Arg - Trp -- Gly -- NH<sub>2</sub>.

Exemple 4

Synthèse du composé 4

15 On opère comme à l'exemple 1 pour préparer :

[(DL) Lip] His --- D.homoPhe --- Arg ---- Trp ---- NH<sub>2</sub>

Constantes physiques...

F - 130°C - Temps de rétention 19,72 minutes

Colonne C18 "Nucléosil" - UV - 279 nm

20 Solvant TFA - 0,1 % Acétonitrile 75/20

débit - 1,2 ml/minute

Analyse des acides aminés

His = 0,80 - Dh- Phé 1,11 Arg = 0,96

Trp = non dosé - Masse chimique - 887,18

25

Exemples 5 à 7

En opérant comme précédemment, on obtient :

composé 5 [N.Lipoyl-Lysine] Glu -- His - D.homoPhe - Arg - Trp -- Gly - NH<sub>2</sub>

composé 6 [N.Lipoyl-Lysine] His - D.homoPhe -- Arg - Trp -- Gly -- NH<sub>2</sub>

30 composé 7 [N.Lipoyl-Lysine] His -- D.homoPhe -- Arg -- Trp -- NH<sub>2</sub>



Exemple 8

Etude de l'activité immunosuppressive du dérivé composé 4 sur l'inhibition de la synthèse de l'Interleukine 1 "IL1" chez la souris.

5 La sécrétion de l'IL1 est induite par l'administration parentérale de lipopolysaccharides "LPS" à la souris BALB/C.

La libération de lipopolysaccharides bactériens lors des infections microbiennes, induit fortement la synthèse et la libération dans l'organisme des monokines Interleukines "1 IL1" Interleukine 6 "IL6" et du "Tumor -  
10 Necrosis - factor"  $\alpha$  TNF qui sont responsables des violentes réactions inflammatoires dont le choc septique.

Matériel

Le composé 4 (P-IV) est mis en solution dans du sérum physiologique. Il est dosé quantitativement par spectrophotométrie à 280 nm  
15 (dosage du Tryptophane) ce qui permet un dosage précis du "P-IV" dans les solutions qui sont conservées à -25 ° C.

Lipopolysaccharides "LPS":

Extraits d'Escherichia Coli serotype O127 - B8 - "Réf. SIGMA - L3137" sont utilisés à la concentration de 6 mg/ml dans du sérum physiologique.

20 Animaux:

Souris BALB/C - femelles - âgées de 5 semaines en provenance de IFFA - CREDO soumises à une photopériode de 12 heures de lumière par 24 heures eau et nourriture ad libitum

Méthodes

25 Deux techniques ont été mises au point pour réaliser ce dosage :  
- l'une basée sur un traitement de 5 jours utilisée pour démontrer l'activité anti-inflammatoire du PIV (appelée technique de "SHEEHAN")  
- l'autre basée sur un seul traitement, par conséquent beaucoup plus rapide servira pour le contrôle de l'activité du PIV (technique de  
30 "DAYNES")

1- Technique de SHEEHAN

a) posologie

Trois posologies sont à l'étude :

- 1 ng de PIV dans 0,2 ml de sérum physiologique (soit 5 ng/ml)
- 0,5 ng de PIV dans 0,2 ml de sérum physiologique (soit 2,5 ng/ml)
- 0,1 ng de PIV dans 0,2 ml de sérum physiologique (soit 0,5 ng/ml)

b) Traitement des animaux

5 Il a été réalisé sur des souris réparties en cinq lots de 5 animaux :

- un lot témoin négatif
- un lot témoin positif
- trois lots PIV (un par posologie)

10 Les animaux des lots témoins reçoivent une injection de 0,2 ml de sérum physiologique par voie sous cutanée, les animaux des lots PIV reçoivent une injection du produit aux diverses posologies par voie sous cutanée. Ce traitement a lieu pendant 5 jours.

c) Induction de l'IL1  $\alpha$

15 Quarante huit heures après le traitement par PIV on injecte par voie intrapéritonéale une dose subléthale de LPS (1,2 mg dans 0,2 ml de sérum physiologique) à chaque animal des lots PIV et du lot témoin positif.

d) Obtention des sérums

20 Cent quatre vingt minutes plus tard toutes les souris sont ponctionnées par les sinus rétroorbitaires sur des tubes secs. Dès que le sang coagule le caillot est décollé. Le sang est centrifugé pendant 10 minutes à 1800 g à la température de 10 ° C.

Les sérums une fois prélevés sont congelés à - 25 ° C

2- Technique de DAYNES

a) Posologie

25 Trois posologies sont étudiées

- 40  $\mu$ g de PIV dans 0,2 ml de sérum physiologique - soit de 200  $\mu$ g/ml
- 25  $\mu$ g de PIV dans 0,2 ml de sérum physiologique - soit de 125  $\mu$ g/ml
- 10  $\mu$ g de PIV dans 0,2 ml de sérum physiologique - soit de 50  $\mu$ g/ml

b) Traitement des animaux

30 Il a été réalisé sur les souris réparties en 5 lots de 5 animaux

- un lot témoin négatif
- un lot témoin positif
- trois lots PIV (1 par posologie)

Les animaux des lots témoins reçoivent une injection de 0,2 ml de sérum physiologique par voie intraveineuse.

Les animaux des lots PIV reçoivent une injection du produit aux diverses posologies par voie intraveineuse. (Veine caudale)

5 c) Induction de l'IL1  $\alpha$

Immédiatement après, on injecte par voie intrapéritonéale une dose subléthale de LPS (1,2 mg ans 0,2 ml de sérum physiologique) à chaque animal des lots PIV et aux lots témoins positifs.

d) Obtention des sérums

10 Cent quatre vingt minutes plus tard toutes les souris sont ponctionnées par les sinus rétroorbitaires sur tubes secs. Dès que le sang coagule le caillot est décollé. Le sang est centrifugé 10 minutes à 1800 g à la température de 10°C. Les sérums une fois prélevés sont congelés à - 25° C.

3- Dosage de l'IL1  $\alpha$

15 L'Interleukine 1  $\alpha$  contenue dans ces sérums est dosée 24 heures après le prélèvement avec le Kit de dosage ELISA IL1  $\alpha$  murine (réf. 1900 00 GENZYME)

- Description rapide du Kit : la méthode utilisée pour ce dosage est de type sandwich.

20 On utilise un premier anticorps monoclonal anti-IL1  $\alpha$  murine

On dépose ensuite les échantillons, puis on fait agir un second anticorps anti IL1  $\alpha$  biotinylé.

La révélation a lieu avec de l'avidine couplée à de la peroxydase.

La réaction colorée utilise de la tétraméthylbenzidine (TMB)

25 La lecture se fait à 450 nm sur un lecteur de plaques MULTISKAN MCC 340 MKII (TITERTEK)

Les résultats obtenus par la méthode de SHEENAN sont rassemblés dans le tableau 1 ci-après :

Tableau 1

	VALEUR MOYENNE  DU TEMOIN POSITIF (en pg/ml)	POURCENTAGE D'ACTIVITE DU PIV PAR POSOLOGIE		
		200 $\mu$ g/ml	125 $\mu$ g/ml	50 $\mu$ g/ml
ETUDE 1	250	-94 %	-50 %	-82 %
ETUDE 2	230	-50 %	-46 %	-31 %
ETUDE 3	200	-62 %	-37 %	-47 %
ETUDE 4	430	-62 %	-49 %	-76 %
ETUDE 5	430	-38 %	-62 %	-58 %

Les diminutions moyennes en IL 1  $\alpha$  obtenues par posologie, sont de l'ordre de 55 % (60 % à 200  $\mu$ g/ml, 50 % à 125  $\mu$ g/ml et 50 % à 50  $\mu$ g/ml) pour l'ensemble de cinq études.

L'ensemble des résultats obtenus confirment l'activité anti-inflammatoire de PIV, à travers son action inhibitrice de la synthèse de IL1 $\alpha$ .

En effet, avec les deux méthodologies utilisées, on observe une diminution de la synthèse de l'Interleukine 1  $\alpha$  d'au moins 50 % par rapport au témoin.

Cette activité anti-inflammatoire a été complétée d'une étude de l'activité immuno-suppressive du PIV vis à vis du Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ .

Les résultats obtenus (-40%) confirment l'activité suppressive du PIV sur la synthèse des Interleukines IL 1 et  $\alpha$  INF.

On observe également une protection des animaux traités ayant reçu une dose léthale de LPS : cette protection se traduisant par un retard du taux de mortalité hautement significatif.

#### Exemple 9

#### Inhibition de l'activité du TNF $\alpha$ par le Peptide PIV

##### Matériel et méthode

On utilise les techniques de DAYNES décrites dans l'exemple 8.

Technique de DAYNES

##### a) Posologie

Trois posologies sont à l'étude

- 40  $\mu$ g de PIV dans 0,2 ml de sérum physiologique - soit de 200  $\mu$ g/ml
- 25  $\mu$ g de PIV dans 0,2 ml de sérum physiologique - soit de 125  $\mu$ g/ml
- 10  $\mu$ g de PIV dans 0,2 ml de sérum physiologique - soit de 50  $\mu$ g/ml

##### b) Traitement des animaux

Il a été réalisé sur les souris réparties en 5 lots de 5 animaux

- un lot témoin négatif
- un lot témoin positif
- trois lots PIV (1 par posologie)

Les animaux des lots témoins reçoivent une injection de 0,2 ml de sérum physiologique par voie intraveineuse. Les animaux des lots PIV reçoivent une injection du produit aux diverses posologies par voie intraveineuse. (Veine caudale)

c) Induction de  $\text{TNF } \alpha$ 

Immédiatement après le traitement des souris, on injecte par voie intrapéritonéale une dose subléthale de LPS (1,2 mg dans 0,2 ml de sérum physiologique) à chaque animal des lots et témoin positif.

## 5 d) Obtention des sérums

Quatre vingt dix minutes plus tard toutes les souris sont ponctionnées par les sinus rétroorbitaires sur tubes secs. Dès que le sang coagule le caillot est décollé. Le sang est centrifugé 10 minutes à  $10^{\circ} \text{C}$  à 1800g.

10 Les sérums une fois prélevés sont congelés à  $-25^{\circ} \text{C}$ .

Dosage du  $\text{TNF } \alpha$ 

Le  $\text{TNF } \alpha$  contenu dans ces sérums est dosé 24 heures après le prélèvement avec le Kit de dosage ELISA du  $\text{TNF } \alpha$  murin (réf. 1509-00 GENZYME)

15 - Description rapide du Kit : la méthode utilisée pour ce dosage est de type sandwich.

On utilise un premier anticorps monoclonal anti- $\text{TNF } \alpha$  murin.

On dépose ensuite les échantillons puis on fait agir un second anticorps de chèvre anti  $\text{TNF } \alpha$ .

20 La révélation a lieu avec un anticorps d'âne anti-immunoglobuline de chèvre, marqué à la peroxydase.

La réaction colorée utilise l'o-phenylene-diamine (OPD).

La lecture a lieu à 492 nm avec un lecteur de plaques (TITERTEK MKII MCC 340)

25 Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 2 ci-après :

Tableau 2

	VALEUR MOYENNE DU TEMOIN POSITIF (en pg/ml)	POURCENTAGE D'ACTIVITE DU PIV PAR POSOLOGIE		
		200 $\mu\text{g/ml}$	125 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$
ETUDE 1	2600	-41 %	-26 %	-31 %
ETUDE 2	4690	-65 %	-53 %	-38 %
ETUDE 3	4690	-52 %	-45 %	-42 %
ETUDE 4	4040	-30 %	-41 %	-41 %
ETUDE 5	4360	-42 %	-34 %	-31 %

Cette méthodologie confirme les résultats moyens obtenus précédemment.

En effet, des diminutions moyennes en TNF  $\alpha$  obtenues par posologie, sont de l'ordre de 40 % (46 % à 200  $\mu\text{g/ml}$ , 40 % à 125  $\mu\text{g/ml}$  et 37 % à 50  $\mu\text{g/ml}$ ) pour l'ensemble des cinq études.

#### Exemple 10

Etude de l'activité Antiallergique des composés Peptidiques, par le test d'Hypersensibilité de contact au Dinitrofluorobenzène (DNFB).

##### Matériel et méthode

Composé 3 "PIII" "Lots 1 - 2 - 3

Composé 4 "PIV" "Lots 4 - 5 - 6

Des souris femelles C57 BL/6JICO, âgées de 5 semaines sont réparties en dix lots de dix animaux (cinq par cage), avec libre accès à l'eau et à la nourriture, soumises à une photopériode de douze heures de lumière par vingt-quatre heures.

Les animaux des lots I à 6 reçoivent quotidiennement et par application topique sur la peau rasée du dos, les produits à étudier, mis en solution dans du propylène glycol, sous un volume constant de 50  $\mu\text{l}$  et cela pendant cinq jours consécutifs.

##### Posologie par souris et par jour

PIII - Lots 1 - 2 - 3 - 2,5  $\mu\text{g}$  - 0,5  $\mu\text{g}$  - 0,1  $\mu\text{g}$  - souris/jour

PIV - Lots 4 - 5 - 6 - 2,5  $\mu\text{g}$  - 0,5  $\mu\text{g}$  - 0,1  $\mu\text{g}$  - souris/jour

Les animaux du lot X servent de témoins (ils reçoivent seulement, 50  $\mu\text{l}$  de propylène glycol par application topique pendant cinq jours).

Au cinquième jour, trente minutes après la dernière application toutes les souris sont sensibilisées avec 25  $\mu\text{l}$  de DNFB ( 2.4 - Dinitro - 1 FluoroBenzène (FLUKA CHEMIKA PURUM à 97 % lot n° 33820890) à 2 % dans un mélange 4 pour 1 d'acétone (SDS réf 0510) et de trioléine (FLUKA) appliqué par voie topique sur la région dorsale de peau rasée.

Au sixième jour, on procède à une nouvelle sensibilisation par application de DNFB.

Au onzième jour, l'épaisseur des oreilles des souris, est mesurée à l'aide d'un micromètre (ROCH 0 à 25 mm au 1/100 mm) afin d'obtenir des valeurs de base, puis les oreilles sont stimulées par application topique de 20 µl de DNFB à 0,8 %.

Au douzième jour, l'épaisseur des oreilles est à nouveau mesurée. On établit la valeur moyenne de l'épaississement des oreilles pour les souris des lots qui ont reçu les produits à étudier, ainsi que pour les souris du lot témoin.

5 Le pourcentage de suppression éventuelle sera exprimé par le

calcul suivant :  $\frac{T - E}{T} \times 100$

Les résultats sont rassemblés aux tableaux 3 à 6 suivants :

Tableau 3  
Résultats PIII

LOTS P III	NOMBRE DE SOURIS	SENSIBILISATION	STIMULATION	RESULTATS	MOYENNES
				OREILLE GAUCHE % AUGMENTATION	OREILLE DROITE % AUGMENTATION
LOT 1 P III (S1) 2,5 µg/souris/jour	10	DOS DNFB 2 %	OREILLES DNFB 0,8 %	19,21	19,21
LOT 2 P III (S1) 0,5 µg/souris/jour	10	DOS DNFB 2 %	OREILLES DNFB 0,8 %	19,81	19,81
LOT 3 P III (S1) 0,1 µg/souris/jour	10	DOS DNFB 2 %	OREILLES DNFB 0,8 %	17,71	17,71
LOT X Témoins	10	DOS DNFB 2 %	OREILLES DNFB 0,8 %	58,92	58,92



Tableau 4  
Résultats PIV

LOTS PIV	NOMBRE DE SOURIS	SENSIBILISATION	STIMULATION	RESULTATS	
				OREILLE GAUCHE % AUGMENTATION	MOYENNES OREILLE DROITE % AUGMENTATION
LOT 4 PIV (S2) 2,5 µg/souris/jour	10	DOS DNFB 2 %	OREILLES DNFB 0,8 %	17,99	17,99
LOT 5 PIV (S2) 0,5 µg/souris/jour	10	DOS DNFB 2 %	OREILLES DNFB 0,8 %	18,03	18,03
LOT 6 PIV (S2) 0,1 µg/souris/jour	10	DOS DNFB 2 %	OREILLES DNFB 0,8 %	20,35	20,35
LOT X Témoins	10	DOS DNFB 2 %	OREILLES DNFB 0,8 %	58,92	58,92

Tableau 5  
Résultats PIII

Pourcentage de suppression de l'hypersensibilité de contact "DNFB"

% de suppression par rapport au Lot Témoin					
selon la formule : $\frac{T - E}{T} \times 100$					
LOT 1 (S1) 2,5 µg/souris/jour		LOT 2 (S1) 0,5 µg/souris/jour		LOT 3 (S1) 0,1 µg/souris/jour	
OREILLE GAUCHE	OREILLE DROITE	OREILLE GAUCHE	OREILLE DROITE	OREILLE GAUCHE	OREILLE DROITE
-67,40	-67,40	-66,38	-66,38	-69,94	-69,94

Tableau 6  
Résultats PIV

Pourcentage de suppression de l'hypersensibilité de contact "DNFB"

% de suppression par rapport au Lot Témoin					
selon la formule : $\frac{T - E}{T} \times 100$					
LOT 4 (S2) 2,5 µg/souris/jour		LOT 5 (S2) 0,5 µg/souris/jour		LOT 6 (S2) 0,1 µg/souris/jour	
OREILLE GAUCHE	OREILLE DROITE	OREILLE GAUCHE	OREILLE DROITE	OREILLE GAUCHE	OREILLE DROITE
-69,47	-69,47	-69,40	-69,40	-65,46	-65,46

PIII et PIV suppriment de façon hautement significative - "67,90 % et 68,11 %" la réaction d'hypersensibilité cutanée induite par administration de DiNitroFluoroBenzène dans les conditions expérimentales décrites précédemment.

5

### Exemple 11

#### Etude de l'activité anti-inflammatoire de PIII et PIV

##### 1) But de l'étude :

Mise en évidence de l'effet inhibiteur des peptides PIII et PIV sur  
10 la production par des fibroblastes stimulés par l'IL 1, d'un métabolite de l'acide arachidonique, la PGE2.

##### 2) Méthodes :

2-1 Culture de fibroblastes pulmonaires embryonnaires d'origine humaine :

15 Nous avons choisi d'utiliser la souche ATCC MRC5 entretenue au laboratoire de façon continue et déjà testée par Cannon et al. (J. Immunol., 1986).

Après un repiquage, les fibroblastes sont cultivés dans des micropuits (plaque de 24 puits de 2 cm<sup>2</sup>, Falcon). L'innoculum est de 30 000  
20 cellules par puits ; le milieu nutritif utilisé est composé de RPMI 1640 (90 %) et de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF, 10 %). Le milieu est changé tous les deux jours jusqu'à confluence des cellules.

##### 2-2 Mise en expérience

Les couches monocellulaires ainsi obtenues sont lavées puis  
25 préincubées pendant 24 heures dans du milieu frais ne contenant que 1 % de SVF. Les substances à tester sont ajoutées au milieu à différentes concentrations comprises entre 10<sup>-6</sup> et 10<sup>-4</sup> M. Après 20 minutes d'incubation en présence de ces composés, l'IL1 recombinante humaine (Tebu, France) à la concentration de 5, 2,5 ou 0,5 ng/ml de milieu est mise en  
30 contact avec des cellules pendant 18 heures.

A la fin de cette incubation les surnageants sont prélevés et congelés à -80° C jusqu'à l'analyse. Les couches monocellulaires sont fixées au méthanol.

## 2-3 Dosage de PGE2

Le dosage RIA est effectué selon la méthode décrite par Dray et al. (Europ. J. Invest. 1975). 3 séries d'expériences en duplicate ont été réalisées pour chaque concentration de produit étudié et pour les contrôles. Les résultats sont exprimés en pg/ $\mu$ g d'ADN. L'effet inhibiteur est exprimé en pourcentage par rapport aux contrôles.

Afin d'éviter toute erreur possible due au comptage en microscopie optique, l'ADN a été dosé par méthode fluorimétrique selon le protocole décrit par Brunk et al. (Analytical Biochem., 1979).

Le tableau 7 ci-après rassemble une 1ère série d'essais sur la souche MRC5

Tableau 7

## Action du PIII

Echantillons PIII	PGE2 pg/ $\mu$ g d'ADN	% d'inhibition
IL1 : 2,5 ng	389 $\pm$ 60	
+ PIII 10 <sup>-4</sup> M	179 $\pm$ 50	53
+ PIII 10 <sup>-5</sup> M	232 $\pm$ 45	40
+ PIII 10 <sup>-6</sup> M	292 $\pm$ 68	24
+ PIII 10 <sup>-7</sup> M	364 $\pm$ 68	6
+ PIII 10 <sup>-8</sup> M	335 $\pm$ 50	13
+ PIII 10 <sup>-9</sup> M	320 $\pm$ 43	17
IL1 : 0,5 ng	288 $\pm$ 25	
+ PIII 10 <sup>-4</sup> M	113 $\pm$ 25	60
+ PIII 10 <sup>-5</sup> M	176 $\pm$ 37	38
+ PIII 10 <sup>-6</sup> M	231 $\pm$ 55	19
+ PIII 10 <sup>-7</sup> M	249 $\pm$ 60	13
+ PIII 10 <sup>-8</sup> M	258 $\pm$ 35	10
+ PIII 10 <sup>-9</sup> M	364 $\pm$ 56	pas d'inhibition

On observe une bonne action inhibitrice de PIII avec rapport effet dose. Cette action ne dépend pas de la concentration en IL1. On n'observe pas d'action à partir de  $10^{-7}$ M dans les deux cas.

5

Tableau 8  
Action de PIV

10	Echantillons PIV	PGE2 pg/mg d'ADN	% d'inhibition
	IL1 : 5 ng	7576 ± 310	
	+ PIV $10^{-4}$ M	2964 ± 184	60
15	+ PIV $10^{-5}$ M	4580 ± 230	38
	+ PIV $10^{-6}$ M	4900 ± 340	34
	+ PIV $10^{-7}$ M	6150 ± 365	17
	+ PIV $10^{-8}$ M	6142 ± 255	17
20	+ PIV $10^{-9}$ M	5047 ± 279	32

PIII et PIV possèdent un pouvoir inhibiteur de l'action de l'IL1 et de la PGE2.

Très significative cette action pourrait être liée à un blocage des récepteurs.

Exemple 12

Etude de l'action de P III et PVI sur la mélanogénèse de la souris après l'application topique sous forme de crème dermique (Technique de Warren).

5           Matériel et méthode

## 1) Matériel

- Composé 3 PIII

[(DL) Lip] - Glu - His - ParaFPhe - Arg - Trp - Gly - NH<sub>2</sub>

- Composé 6 PIV

10           [N.Lipoyl - Lysine] - His - D.homoPhe - Arg - Trp - Gly - NH<sub>2</sub>

- Excipient dermique n° 66

Lano - vaseline - Ac

Huile de vaseline Pharmacopée

Cire d'abeille Ethoxyle

15           Lanoline purifiée

PEG - 200

Formules dermiques

Peptides PIII et PVI incorporés à raison de 5 % dans l'excipient dermique n° 66

20           Animaux

Souris DBA/2 IFFA - CREDO âgées de 5 semaines

## 2) Méthodes

- On délimite sur chaque animal une tonsure dorsale après épilation
  - Les produits à essayer sont appliqués par massage à raison de 2 applications
  - 25   par jour, de 50 µl de chaque préparation pendant 5 jours
  - Deux jours après la dernière application, on sacrifie les animaux et on prélève des fractions de 50 mg environ de peau traitée.
  - Chaque prélèvement est desséché par lyophilisation et pesé
  - Les fragments de peau sont ensuite soumis à une hydrolyse enzymatique
  - 30   par la protéase K pendant 72 heures à 45 ° C
- (Protéase K Merck - 24.568)
- On ajoute aux hydrolysats obtenus 500 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et 20 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 35 %
  - On met à incuber 30 minutes à 80 ° C

- Après refroidissement on ajoute à chaque échantillon 200 µl de chloroforme / méthanol (2 vol/1 vol)
- On centrifuge à 10 000 g
- On répartit la phase aqueuse (200 µl) dans les puits d'une microplaque

5 "NUNC"

Dosage de la Mélanine

- Le dosage de la mélanine s'effectue à 405 nm à l'aide d'un Multiskan - Titertek - MCC - 340, comparativement à une gamme étalon de mélanine Sigma M. 8631

10 Résultats

Ils sont exprimés en pourcentage de mélanine comparativement aux excipients considérés comme témoins

I - Crème P III - 5 10<sup>-5</sup> M de PIII pour 50 µl de crème

II - Crème PVI - 5 10<sup>-5</sup> M de PVI pour 50 µl de crème

15 III - Excipient 66 - comme témoin T

Moyenne des résultats sur 15 dosages

20

Echantillons	% de Mélanine en mg
I Crème PIII	4 mg %de mélanine
II Crème PVI	71 m %de mélanine
III Excipient 66 - Témoin	0 mg % de mélanine

Tableau 9

Pourcentage de stimulation

QE = quantité moyenne de mélanine par mg de peau - Echantillon

QT = quantité moyenne de mélanine par mg de peau - Témoin

$$\% \text{ de stimulation} = \frac{QE - QT}{QT} \times 100$$

5

La crème dermique contenant PVI administré par voie topique, induit de façon hautement significative la synthèse de la Mélanine au niveau de l'épiderme (+71 %).

10 Cette activité conforme à l'objet de la présente invention est liée à la structure chimique de PVI qui contient des groupements N.Lipoyl - Lysine et D.homoPhenyl.

15 La crème dermique dont la formule contient PIII administrée par voie topique, n'a pas d'activité sur la stimulation de la Mélanogénèse Epidermique, cette absence d'activité est liée à la présence dans la structure PIII du groupement "para.FluoroPhenyl" conformément à l'objet de la présente invention.

Ces résultats ont été confirmés par une étude sur la Mélanogénèse selon la technique de "CLOUDMAN" par culture de mélanocytes in vitro, en utilisant les cellules du mélanome de CLOUDMAN chez le rat.

20 L'ensemble des résultats obtenus sont conformes à l'objet de la présente invention dont l'objectif est la réalisation de dérivés peptidiques actifs par voie Topique et dont les activités anti allergiques et anti inflammatoires peuvent être séparées de l'activité sur la Melanogénèse selon les applications envisagées.

25

### Exemple 13

Etude comparative de l'activité des Lipoyl-Peptides et de leurs structures peptidiques, sur l'hypersensibilité de contact au D.N.F.B.

30

#### Matériel et méthode

La méthode utilisée est celle décrite précédemment dans l'exemple 10.



Hypersensibilité de contact induite chez la souris par la Dinitrofluorobenzène -"D.N.F.B."

#### Produits étudiés

Lot I : (DL) - Lip - Glu - His - D.homoPhe - Arg - Trp - Gly - NH<sub>2</sub>

5 Lot II : H - Glu - His - D.homoPhe - Arg - Trp - Gly - NH<sub>2</sub>

Lot III : Témoin = Acide (DL) Lipoïque

Solvant : le propylène Glycol précédemment employé comme témoin dans l'exemple 10.

10 Une mesure de l'activité du témoin sera effectuée pour chaque expérimentation.

#### Expérimentation et posologie

Lot I : Doses utilisées

1=1 µg/souris/jour

2=10 µg/souris/jour

15 3=100 µg/souris/jour

Lot II : Doses utilisées

4=1 ng/souris/jour

5=10 ng/souris/jour

6=100 ng/souris/jour

20 Témoin : dose utilisée "DL-Lipoïc-Acide" = 10 ng par souris et par jour.

Au cinquième jour, trente minutes après la dernière application toutes les souris sont sensibilisées avec 25 µl de D.N.F.B. (2.4-Dinitro-1 FluoroBenzène (FLUKA CHEMIKA PURUM à 97 % lot n° 33820890) à 2 % dans un mélange 4 pour 1 d'acétone (SDS réf. 05510) et de trioléine (FLUKA) appliqué par voie topique sur la région dorsale de peau rasée.

25 Au sixième jour, on procède à une nouvelle sensibilisation par application de D.N.F.B.

Au onzième jour, l'épaisseur des oreilles des souris, est mesurée à l'aide d'un micromètre (ROCH 0 à 25 mm au 1/100 mm) afin d'obtenir des valeurs de base, puis les oreilles sont stimulées par application topique de 20 µl de D.N.F.B. à 0,8 %.

30 Au douzième jour, l'épaisseur des oreilles est à nouveau mesurée. On établit la valeur moyenne de l'épaississement des oreilles pour les souris des lots qui ont reçu les produits à étudier, ainsi que pour les souris du lot témoin. Le pourcentage de suppression éventuelle sera exprimé par le calcul.

35 suivant: :  $\frac{T-E}{T} \times 100$

Tableau 10

**SOURIS : HYPERSENSIBILITÉ DE CONTACT**  
**TABLEAU RECAPITULATIF LOT I**

5	LOTS	NOMBRE DE SOURIS	SENSIBILISATION	STIMULATION	RESULTATS	: MOYENNE
					Oreille gauche Moyenne % Augmentation	Oreille droite Moyenne % Augmentation
10	Lot I : 100 ng/souris/jour	10	Dos DNFB 2 %	Oreilles DNFB 0,8 %	11,66	11,66
	Lot I : 10 ng/souris/jour	10	Dos DNFB 2 %	Oreilles DNFB 0,8 %	12,95	13,01
15	Lot I : 1 ng/souris/jour	10	Dos DNFB 2 %	Oreilles DNFB 0,8 %	13,86	13,86
	Témoins	10	Dos DNFB 2 %	Oreilles DNFB 0,8 %	56,34	56,75

20

Tableau 11

**SOURIS LOT I**  
**HYPERSENSIBILITE DE CONTACT - DNFB**

25

% DE SUPPRESSION PAR RAPPORT AU LOT TEMOIN SELON LA FORMULE : $\frac{T-E}{T} \times 100$					
Lot I : 100 ng/souris/jour		Lot I : 10 ng/souris/jour		Lot I : 1 ng/souris/jour	
Oreille gauche	Oreille droite	Oreille gauche	Oreille droite	Oreille gauche	Oreille droite
-79,30	-79,45	-77,01	-78,90	-75,40	-75,58

30

Tableau 12

**SOURIS : HYPERSENSIBILITÉ DE CONTACT - DNFB**  
**TABLEAU RECAPITULATIF LOT II**

5	LOTS	NOMBRE DE SOURIS	SENSIBILISATION	STIMULATION	RESULTATS	: MOYENNE
					Oreille gauche	Oreille droite
					Moyenne % Augmentation	Moyenne % Augmentation
10	Lot II : 1 ng/souris/jour	10	Dos DNFB 2 %	Oreilles DNFB 0,8 %	37,07	37,07
	Lot II : 10 ng/souris/jour	10	Dos DNFB 2 %	Oreilles DNFB 0,8 %	34,84	34,84
	Lot II : 100 ng/souris/jour	10	Dos DNFB 2 %	Oreilles DNFB 0,8 %	43,10	43,10
15						
20	LOT TEMOINS	10	Dos DNFB 2 %	Oreilles DNFB 0,8 %	58,92	58,92

Tableau 13

**SOURIS : HYPERSENSIBILITE DE CONTACT - DNFB**

% DE SUPPRESSION PAR RAPPORT AU LOT TEMOIN SELON LA FORMULE : $\frac{T-E}{T} \times 100$					
Lot II : 1 ng/souris/jour		Lot II : 10 ng/souris/jour		Lot II : 100 ng/souris/jour	
Oreille gauche	Oreille droite	Oreille gauche	Oreille droite	Oreille gauche	Oreille droite
37,08	37,08	40,83	40,87	27,15	27,15

### Résultats

#### Lot I - Lipoyl-Peptide - I

On observe 79 % de suppression de l'hypersensibilité cutanée à la dose de 100 ng/souris/jour.

- 5 On observe également une nette relation doses/effets entre les doses de 1 ng - 10 ng et 100 ng.

#### Lot II - Peptide seul

On observe 40 % de suppression de l'hypersensibilité cutanée à la dose de 10 ng/souris/jour.

- 10 Pour les doses de 1 ng et de 100 ng, la réponse suppressive est de l'ordre de 37,08 et 27,15 %, sans que l'on puisse observer une relation du type doses/effets.

#### Lot témoin - Acide Lipoïque seul

- 15 On n'observe pas d'effet suppressif de l'hypersensibilité cutanée par administration de l'acide Lipoïque, en solution dans le Propylène - Glycol.

Administrés par voie topique et dans les conditions expérimentales décrites, la structure "Lipoyl Peptide" induit de façon hautement significative la suppression de l'hypersensibilité cutanée chez la souris.

### 20 Exemple 14 Embryo - Toxicologie

#### Analyse qualitative et quantitative des effets de P IV sur la différenciation mélanocytaire en culture in vitro.

Echantillon à analyser - composé 4 = PIV

#### Matériel biologique

- 25 Cellules embryonnaires isolées en culture in vitro dans un milieu défini, purement salin (conditions standard de culture : 2 ml de milieu/culture).

- 30 Le territoire embryonnaire est prélevé (sur l'embryon de Pleurodèle et sur l'embryon d'Axolotl) dès la première étape de la mélanogénèse, immédiatement après l'induction mélanocytaire.

A ce stade précoce du développement embryonnaire, le bourrelet neural, qui vient de s'individualiser, renferme l'ensemble des précurseurs mélanoblastiques. La mise en culture des cellules du bourrelet neural et du mésoderme sous-jacent permet de cocultiver (dans des conditions totalement

identiques) les mélanoblastes avec différents autres précurseurs cellulaires appartenant à des catégories variées : neuroblastes myoblastes, cellules épidermiques, fibroblastes, cellules mésenchymateuses.

Ceci permet une étude cinétique comparative, sur le vivant, des effets de PIV sur les mélanocytes et divers autres types cellulaires.

Durée de la culture (culture primaire) : 2 à 3 semaines à 20°C.

La différenciation cellulaire apparait morphologiquement dès le 3ème jour et est quasiment terminée à 8-10 jours de culture.

#### Traitements

##### 10 1° Essais dose/réponse

Une gamme de concentrations de PIV a été analysée :

0,01 µg/ml ; 0,1 µg/ml ; 1 µg/ml ; et 10 µg/ml

0,01 µg/ml : pas d'effet

15 1 µg/ml : effet optimal sur la différenciation mélanocytaire  
(suivant les critères indiqués dans "Résultats")

Sont donc retenues pour ces travaux les 2 doses : 0,1 et 1 µg/ml.

##### 2° Traitements

1 seul traitement lors de l'ensemencement des cellules en culture.

20 Après leur attachement (3 jours à 20°C) le milieu est remplacé par du milieu frais sans le Peptide PIV

1 traitement lors de l'ensemencement et un 2ème traitement lors du changement de milieu.

#### Résultats

##### Effets d'ordre qualitatif

25 1°) Effet stimulant de PIV sur la mélanogénèse

2°) Cet effet ne s'accompagne pas de phénomènes de cytotoxicité.

30 3°) Les autres catégories cellulaires cultivées ne sont pas touchées, leur morphologie et leur différenciation se déroulent normalement, excepté celles des neurones qui présentent des prolongements neuritiques plus courts et en réseau plus dense que chez les témoins. Il est à remarquer que ces neurones sont issus de la crête neurale (bourrelet neural) et sont donc les neurones à l'origine du système nerveux périphérique.

4°) Aucun effet toxique ne se manifeste, l'ensemble des cellules, autres que les mélanoblastes, se différencient et évoluent comme les cellules témoins non traitées.

#### Analyses quantitatives

5 L'effet suivant de PIV sur la mélanogénèse se traduit non seulement par une augmentation de la taille des mélanocytes (Cf. planche I et II) mais également :

5°) par une augmentation de leur nombre ;

6°) par une augmentation de la quantité de mélanine biosynthétisée.

10 A - Effet stimulant de PIV sur la mélanogénèse

1°) Il est d'ores et déjà important de souligner que les effets stimulants décrits ci-après se manifestent de façon analogue après 2 traitements ou un seul traitement (dans ce cas, les cellules sont maintenues en présence de PIV pendant les seuls 2 premiers jours de culture, lorsqu'elles sont encore des  
15 mélanoblastes morphologiquement indifférenciés.

Il n'est donc pas nécessaire, pour avoir une stimulation optimale, de maintenir ces cellules en présence de PIV pendant toute la période de leur différenciation.

20 L'effet stimulant de PIV s'est manifesté de façon tout à fait identique sur les cellules embryonnaires de Pleurodèles comme d'Axolotl.

2°) La différenciation phénotypique des mélanocytes apparaît plus rapidement dans les cultures traitées (dès le 2ème jour après l'ensemencement) que dans les cultures témoins.

3°) La stimulation de la mélanogénèse porte sur la taille des mélanocytes qui  
25 s'accroît d'un facteur x 4 et même x 5 après 8 jours de culture pour un traitement par 1 µg/ml.

4°) L'effet stimulant de PIV porte également sur la quantité de mélanine biosynthétisée.

Déjà la seule observation, sur le vivant, des mélanocytes traités  
30 permet de constater qu'ils sont beaucoup plus sombres, malgré leur plus grande taille, que les mélanocytes témoins.

Nous avons mis au point deux dosages de mélanine :

- par HPLC avec détection électrochimique

- par spectrophotométrie (par adaptation de la méthode de TOMITA  
35 et al., 1990) à 470 nm.

La mise au point de ces dosages a été effectuée à partir de solutions-standard de mélanine (Sigma, réf. M 8631) afin de définir la sensibilité comparative et le seuil minimal de détection par l'une et l'autre des méthodes. Le  $\mu\text{g}$  est le seuil minimal dosable par spectrophotométrie, le ng est le seuil inférieur, dosable par HPLC.

Il est toutefois à remarquer que ces deux techniques, notamment le dosage spectrophotométrique, sont utilisables puisque, pour nos cultures cellulaires, 15 explants embryonnaires associés en culture suffisent pour permettre une quantification (en spectrophotométrie).

Tableau 14

	Cultures témoins (15 explants)	Cultures traitées (15 explants)	Stimulation
1ère expérience	830 ng/explant	2120 ng/explant	x 2,5
2ème expérience	950 ng/explant	2150 ng/explant	x 2,3
3ème expérience	1820 ng/explant	2710ng/explant	x 1,5
4ème expérience	1913 ng/explant	4782 ng/explant	x 2,5

Il est à remarquer que les mélanocytes traités ne présentent aucun signe apparent de cytotoxicité. De plus, ils ont une durée de vie équivalente à celle des mélanocytes témoins in vitro.

B - Effets de piv sur les autres catégories cellulaires co-cultivées  
Cellules épidermiques ciliées et non ciliées, cellules  
mésenchymateuses, fibroblastes :

- pas de prolifération cellulaire particulière
- pas d'effet stimulant sur leur dimension, leur étalement...
- pas d'effet cytotoxique
- pas de retard ni d'accélération dans leur différenciation, ni leur
- 5       comportement in vitro.

Neuroblastes (origine embryonnaire du SNP) :

- pas d'effet stimulant particulier sur le nombre des neurones, ni sur la taille des corps cellulaires (planche II, A).

Effet sur la morphologie du réseau neuritique :

- 10       Dans l'ensemble, le réseau neuritique dans les cultures traitées est constitué de neurites plus courts et plus dispersés que les neurites témoins.

Cette observation devra être analysée plus finement.

- 15       L'ensemble des observations et des quantifications ont été réalisées sur plusieurs séries expérimentales afin de contrôler parfaitement la reproductibilité des phénomènes décrits.

#### Exemple 15

20       Effets des Peptides PI et PIV sur les cellules embryonnaires en culture in vitro... "Mélanocytes - Neurones - Cellules Musculaires et Fibroblastes..."

#### Matériel et méthodes

Les conditions expérimentales mises en œuvre sont les suivantes :

- dose utilisée 1 µg/ml (définie par essais dose/réponse)
- 1 seul traitement lors de l'ensemencement des cellules ou plusieurs
- 25       traitements successifs (renouvellement du milieu chaque 48 heures)
- durée de culture : 6 à 8 jours
- quantification
- 1) Comptage des mélanocytes
- 2) Dosage de mélanine par HPLC et/ou par spectrophotométrie
- 30       - Observation quotidienne des cultures
- Ultrastructure en microscopie électronique à transmission.



Effets stimulants de PI et de PIV sur la mélanogenèse

Le traitement par le PI et le PIV des cellules embryonnaires précurseurs des mélanocytes, stimule leur différenciation tant sur un plan qualitatif, que sur un plan quantitatif. Le nombre de mélanocytes croît au minimum d'un facteur 2 par culture.

La quantité de mélanine biosynthétisée par cellule croît également d'un facteur équivalent (1,4 ng/cellule) après huit jours de culture.

Des essais préliminaires d'étude en microscopie confocale avec le système SAMBA 2005 de TITN - ALCATEL montrent qu'il sera possible d'analyser les particules de mélanine (mélanosomes) elles-mêmes.

Les formules peptidiques PI et PIV stimulent la différenciation des mélanoblastes. Il est important de souligner le résultat remarquable suivant : elles ne stimulent pas les cellules embryonnaires précurseurs non encore déterminées dans la voie mélanoblastique. Elles ne sont donc pas des inducteurs et n'ont comme cible que le mélanoblaste : pas d'effet sur les cellules précurseurs ; effet stimulant sur les mélanoblastes déjà induits).

Analyse de la cytotoxicité de PI et PIV- Neuroblastes

Les deux formules peptidiques étudiées n'ont aucun effet, toxique ou stimulant, sur les neuroblastes ou les neurones.

La taille des corps cellulaires, la longueur et le nombre de neurites, l'ultrastructure et enfin la durée de vie des neurones traités sont équivalents à ceux des neurones témoins.

- Cellules gliales (astrocytes)

Aucun effet toxique n'est observé sur les cellules astrogliales traités par PI et PIV qui se différencient normalement et sans retard par rapport aux astrocytes témoins.

- Myoblastes

Ici encore aucun effet toxique n'est détecté même à un niveau ultrastructural.

Les myoblastes s'étalent et se différencient sans retard et sans anomalie par rapport aux myoblastes -contrôle.

- Fibroblastes, mesenchyme

Des résultats analogues sont obtenus : aucun effet toxique n'est observé.

5 L'ensemble des travaux de cytologie et de biochimie sur les effets PI et PIV sur la mélanogénèse d'une part et sur la différenciation de diverses autres catégories cellulaires d'autre part, démontrent que :

- Le PI et le PIV stimulent la mélanogénèse tant au plan qualitatif qu'au plan quantitatif.

10 - Le PI et le PIV sont sans effet stimulant sur les autres types cellulaires étudiés : neurones, astrocytes, cellules musculaires, fibroblastes, ...

- Le PI et le PIV n'ont pas d'effet cytotoxique sur ces diverses catégories cellulaires qui se différencient et évoluent tout à fait normalement.

REVENDICATIONS

1) Composé comportant une séquence peptidique comprenant au moins une séquence de 4 acides aminés provenant de l' $\alpha$ -MSH, les acides aminés étant sous forme naturelle ou non, ladite séquence étant conjuguée avec l'acide thioctique ou un dérivé de cet acide, sous forme de sels, esters ou amides correspondants.

2) Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la séquence peptidique comporte au moins la séquence suivante :

- His - Phe - Arg -

10 dans laquelle Phe représente la phénylalanine ou un dérivé halogéné de la phénylalanine, les acides aminés pouvant être sous forme D, L ou DL.

3) Composé selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il présente la formule :

[Lip] X - His - Phe - Arg - Y

15 dans laquelle

Lip est l'acide thioctique ou un de ses dérivés,

X est Glu, OH ou NH<sub>2</sub>,

Y est Trp - Gly - OH,

Trp - Gly - NH<sub>2</sub>

20 Trp - NH<sub>2</sub>

Trp - OH

Phe est homo Phe ou p-fluoro Phe,

les acides aminés étant sous forme D, L ou DL.

4) Composé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les dérivés de l'acide thioctique sont choisis parmi l'acide thioctique, l'acide dihydrolipoïque et la N- lipoyl-lysine.

5) Composé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comporte au moins l'une des séquences suivantes :

I [(DL) Lip] - Glu -- His -- D.homoPhe -- Arg -- Trp -- Gly -- NH<sub>2</sub>

30 II [(DH Lip) - Glu -- His -- D.homoPhe -- Arg -- Trp -- Gly -- NH<sub>2</sub>

III [(DL) Lip] - Glu -- His -- ParaFluoroPhe -- Arg -- Trp -- Gly -- NH<sub>2</sub>

IV [(DL) Lip] His -- D.homoPhe -- Arg -- Trp -- NH<sub>2</sub>

V [ N.Lipoyl-Lysine] - Glu -- His -- D.homoPhe -- Arg -- Trp -- Gly -- NH<sub>2</sub>

VI [ N. Lipoyl-Lysine]- His --- D.homoPhe -- Arg --- Trp -- Gly -- NH<sub>2</sub>

VII[ N.Lipoyl-Lysine] - His --- D.homoPhe --- Arg --- Trp --- NH<sub>2</sub>

ainsi que les dérivés de ces molécules sous forme de sels d'esters ou d'amides.

- 5 6) Composé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que certains acides aminés sont glycosylés et/ou sulfatés.

7) Composition pharmaceutique comportant à titre de principe actif au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 5.

8) Composition selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle est formulée pour être administrée par voie orale ou intrapéritonéale.

- 10 9) Composition selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle est formulée pour être administrée par voie topique externe.

10) Composition selon l'une des revendications 7 à 9, caractérisée en ce qu'elle est destinée au traitement des allergies et/ou des réactions inflammatoires.

- 15 11) Composition dermo-cosmétique comportant au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 6.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.

PCT/FR 94/01108

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K7/06 A61K7/48 A61K38/07 A61K38/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 108, no. 4, 25 January 1988, Columbus, Ohio, US; abstract no. 26828z, K HASUNUMA 'Skin conditioners containing thioctic acid derivatives' page 321 ; see abstract & JP,A,62 175 415 (KANEBO LTD.) 24 July 1987	9-11
A	EP,A,0 292 291 (UNIVERSITY PATENTS INC.) 23 November 1988 see the whole document --- -/--	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 January 1995

Date of mailing of the international search report

25.01.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Masturzo, P

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.

PCT/FR 94/01108

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>JOURNAL OF IMMUNOLOGY., vol.148, no.2, 15 January 1992, BALTIMORE US pages 445 - 450 N TUAILLON ET AL. 'A lipoyl synthetic octadecapeptide of dihydrolipoamide acetyltransferase specifically recognized by anti-M2 autoantibodies in primary biliary cirrrrhosis' see table 1</p> <p>-----</p>	1-6

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inventor's Application No

PCT/FR 94/01108

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP-A-62175415	01-08-87	JP-B- 1046483	09-10-89
		JP-C- 1559791	31-05-90
-----			
EP-A-0292291	23-11-88	AT-T- 109793	15-08-94
		AU-B- 618733	09-01-92
		AU-A- 1650688	24-11-88
		DE-D- 3851002	15-09-94
		JP-A- 1070499	15-03-89
-----			

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Derivationale No  
PCT/FR 94/01108

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C07K7/06 A61K7/48

A61K38/07 A61K38/34

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 108, no. 4, 25 Janvier 1988, Columbus, Ohio, US; abstract no. 26828z, K HASUNUMA 'Skin conditioners containing thioctic acid derivatives' page 321 ; voir abrégé & JP,A,62 175 415 (KANEBO LTD.) 24 Juillet 1987	9-11
A	EP,A,0 292 291 (UNIVERSITY PATENTS INC.) 23 Novembre 1988 voir le document en entier	1-8
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

11 Janvier 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

25.01.95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Masturzo, P



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De l'Organisation Internationale No  
PCT/FR 94/01108

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>JOURNAL OF IMMUNOLOGY., vol.148, no.2, 15 Janvier 1992, BALTIMORE US pages 445 - 450 N TUAILLON ET AL. 'A lipoyl synthetic octadecapeptide of dihydrolipoamide acetyltransferase specifically recognized by anti-M2 autoantibodies in primary biliary cirrhosis' voir tableau 1</p> <p>-----</p>	1-6

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De la demande internationale No

PCT/FR 94/01108

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
JP-A-62175415	01-08-87	JP-B- 1046483	09-10-89
		JP-C- 1559791	31-05-90
EP-A-0292291	23-11-88	AT-T- 109793	15-08-94
		AU-B- 618733	09-01-92
		AU-A- 1650688	24-11-88
		DE-D- 3851002	15-09-94
		JP-A- 1070499	15-03-89